


JUL 31 2000

(19)  **Europäisches Patentamt**
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 962 536 A1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
08.12.1999 Patentblatt 1999/49

(51) Int. Cl.⁶: **C12Q 1/68**

(21) Anmeldenummer: 99110458.9

(22) Anmeldetag: 29.05.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 04.06.1998 DE 19824900

(71) Anmelder: **Roche Diagnostics GmbH**
68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder:
• **Weindel, Kurt, Dr.**
82407 Wielenbach (DE)
• **Brand, Joachim**
82380 Peissenberg (DE)

(54) **DNA-Nachweis über einen Strangreassoziationskomplex**

(57) Durch die Kombination markierter Primer zur Herstellung von Amplifikaten des einen Strangs einer Nucleinsäure mit einer Fangsonde, die komplementär zu demselben Strang der Nucleinsäure wird eine Erhöhung der Diskriminierungsfähigkeit bei Hybridisierungsassays erreicht.

EP 0 962 536 A1

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren unter Verwendung der Amplifikation der Nucleinsäure mit Hilfe markierter Primer sowie Nachweis des Amplifikates mit Hilfe einer Fangsonde.

[0002] Biospezifische Binding Assays, die mittels molekularer Erkennungsmechanismen den Nachweis bestimmter Analyte bzw. Analytmerkmale ermöglichen, sind aus Diagnostik und Bioanalytik nicht mehr wegzudenken. Dabei haben sich in den letzten Jahren neben den Immunoassays und Rezeptor Ligand-Assays Hybridisierungsassays fest etabliert. In Hybridisierungsassays wird das Prinzip der Paarung von Nukleobasen (A::T; G::C) zur molekularen Erkennung bestimmter Analytnukleinsäuren (z. B. DNA, RNA) durch Sonden mit gewünschter Spezifität ausgenutzt. So sind z. B. mit Oligonucleotidsonden, die aus 18 - 20 Nucleotiden in ausgewählter Sequenz aufgebaut sind, eindeutige Erkennungen selbst über das menschliche Genom hinweg möglich.

[0003] Eine interessante und vielversprechende Erweiterung erfahren Hybridisierungsassays (= probe based assays) durch sogenannte NA Chip-Technologien. Hier sind auf einem Testträger mindestens 2, meist mehrere bis sehr viele Sonden (probes) mit unterschiedlichen Sequenzen und somit unterschiedlicher Spezifität in einem geometrischen Muster in getrennten Bereichen gebunden, so daß entsprechend viele Hybridisierungsreaktionen zwischen Sonden und Nucleinsäureanalyt-Segmenten bzw. verschiedenen Nucleinsäure-Analyten parallel durchgeführt werden können. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen, z. B. Sequenzauswahl, Puffermilieu, Salzgehalt und vor allem Inkubations- und Waschttemperaturen, gelingt es, nur solche Hybridisierungskomplexe festphasengebunden zu halten, bei denen alle in der Oligonucleotidsonde enthaltenen Nucleotide komplementär sind zu den entsprechenden Nucleotiden im Analytmolekül, so daß die volle Bindungsstärke resultiert. Man spricht dann von vollständiger Basenpaarung (perfect match, PM).

[0004] Hybridisierungskomplexe, die Fehlpaarungen (mismatches, MM) enthalten, werden unter solchen Bedingungen abgelöst. Unter optimalen Bedingungen können sogar Komplexe mit vollständigen Basenpaarungen von Komplexen mit 1-Punkt-Fehlpaarungen (single base transitions) eindeutig unterschieden werden. Da dies parallel unter Anwendung eines geometrischen Fangsondenmusters (array) auf der Festphase geschieht, spricht man von probe array testing.

[0005] Die Fangsonden können alle eine konstante Länge (Anzahl Nucleotidbausteine) haben, oder die Oligo-Länge kann dem GC-Gehalt umgekehrt proportional angepaßt sein. Im ersten Fall kann eine gemeinsame Schmelztemperatur T_m für alle vollständig gepaarten Hybridisierungskomplexe erreicht werden durch Pufferadditive, die z. B. AT-Bindungen so verstärken, daß T_m unabhängig von der Nucleobasensequenz und allein abhängig von der Oligo-Länge wird. Beispiele für solche Additive sind Tetramethylammonium-chlorid (TMAC) und Tetraethylammonium-bromid. Im zweiten Fall bewirkt die angegebene Längenadaptation eine T_m -Nivellierung. Die Fangsonden können chemisch unterschiedliche Backbones haben, welche die spezifitätsvermittelnden Nucleobasen tragen; z. B. Deoxyribosyl-phosphodiester-Stränge (\Rightarrow DNA), Ribosyl-phosphodiester-Stränge (\Rightarrow RNA), oder aber einer nicht natürlichen Substanzklasse angehören, z. B. N-(2-Aminoethyl)glycyl- oder N-(2-Aminoethyl)glutamyl-Stränge (\Rightarrow PNA, WO 92/20702).

[0006] Probe array testing ist für viele molekularbiologische oder diagnostische Anwendungen interessant. Dazu gehört Multi-Pathogen Testing (simultaner Nachweis verschiedener Krankheitserreger auf Genebene), (Sub-)Typisierung von Organismen, Analyse von genetischer Diversität (Polymorphismen, Mutationen), Sequenzierung von Genen oder Genomen, etc..

[0007] Nucleinsäuren sind vergleichsweise komplexe Analyte, die in der Regel zuerst isoliert, dann amplifiziert, und im Falle von DNA einzelsträngig gemacht (denaturiert) werden müssen, bevor sie in einem probe based assay oder probe array testing eingesetzt werden können. Von diesem Aufarbeitungsgang her und der Tatsache, daß komplementär Nucleobasen auch eine Neigung zur Basenpaarung innerhalb ein und desselben Stranges haben, ergeben sich einige typische Schwierigkeiten, wie z. B. variable Analyt-Titer in der Reaktionslösung aufgrund schwankender Effizienz bei der Isolierung oder Amplifikation, suboptimale Denaturierungseffizienz, Reassoziierung der Einzelstränge einer DNA zum ursprünglichen Doppelstrang als Konkurrenz zur Hybridisierung eines Einzelstrangs mit der Sonde, strang-interne Hybridisierung (Sekundärstrukturbildung, z. B. Haarnadelschleifen oder Kreuzformationen) als Konkurrenz zur Sondenhybridisierung. Diese ist umso stärker, je höher der palindrome Index, d. h. die Selbstkomplementarität, eines DNA- oder RNA-Stranges ist.

[0008] Besonders die letzten beiden Phänomene bestimmen wesentlich die Zugänglichkeit der dem Test zugrundeliegenden Sequenzregion des Analyten und limitieren dadurch die Gesamt-Performance über ein Array von Fangsonden hinweg.

[0009] Bei der Amplifikation der Analytnukleinsäure bedient man sich meistens der sog. PCR-Methode (polymerase chain reaction, US-A-4,683,202). Dabei hat man die Möglichkeit, gleich bei der Amplifikation eine nachweisbare Gruppe einzubauen, z. B. ein Digoxigenin-Derivat (DIG-Markierung, EP-B-0 324 474). Dies kann geschehen, indem man im Nucleosidtriphosphat-Mix ein Teil des dTTP ersetzt durch DIG-dUTP.

[0010] In DE-A-3807994 (US-A-5,476,769) ist ein Verfahren beschrieben, in dem detektierbar markierte Amplikonstränge an einer immobilisierbaren Fangsonde hybridisiert und die gebildeten Hybride nachgewiesen werden.

[0011] In EP-A-0 079 139 ist das sogenannte Sandwich-Hybridisierungsverfahren beschrieben, in dem eine nachzuweisende Nucleinsäure durch Hybridisierung mit einer Fangsonde und einer Nachweissonde, die zu unterschiedlichen Bereichen der Nucleinsäure komplementär sind, nachgewiesen werden.

[0012] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Hybridisierungsassays, die auf einer Abfangreaktion von Amplifikaten, die unter Einbau einer Markierung erzeugt wurden, zu verbessern, insbesondere hinsichtlich ihrer Diskriminierung zwischen zwei oder mehr Nukleinsäuren mit sehr nahe verwandten Sequenzen.

[0013] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum selektiven Nachweis einer Nucleinsäure enthaltend die Schritte Amplifikation der Nucleinsäure oder eines Teils davon mit Hilfe zweier Primer, von denen einer mit einem Strang der nachzuweisenden Nucleinsäure und der andere mit einem hierzu komplementären Strang hybridisieren kann und von denen mindestens einer eine nachweisbare Markierung gebunden enthält, unter Bildung jeweils eines Verlängerungsproduktes dieser Primer in einer Reaktionsmischung, Bindung einer Fangsonde an eines dieser Verlängerungsprodukte unter Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes, der die Fangsonde und mindestens dieses Verlängerungsprodukt enthält, Abtrennung des an die Fangsonde gebundenen Verlängerungsproduktes von nicht gebundenen Anteilen der Reaktionsmischung, und Bestimmung der an die Fangsonde gebundenen nachweisbaren Markierung, wobei die Fangsonde so gewählt wird, daß sie mit dem Strang des Verlängerungsproduktes binden kann, der auch mit dem durch Verlängerung des markierten Primers gebildeten Verlängerungsprodukt hybridisieren kann.

[0014] In FIG 1 ist schematisch die Benennung der einzelnen Komponenten der Amplifikation im Sinne der Erfindung gezeigt. Hierbei bedeuten:

P1 forward-Primer
 P2 reverse-Primer
 T1 sense-Tochterstrang (sense-Verlängerungsprodukt)
 T2 anti-sense Tochterstrang (anti-sense-Verlängerungsprodukt)
 M1 anti-sense Matrizenstrang (Templat); Strang der nachzuweisenden Nucleinsäure
 M2 sense-Matrizenstrang (Templat); Gegenstrang zur nachzuweisenden Nucleinsäure

[0015] In FIG 2 ist schematisch ein schon festphasengebundener Komplex mit den Strängen T1 (unmarkiert), T2 (5'-terminal markiert) und der festphasengebundenen Sonde P gezeigt. Das Rechteck ist eine detektierbare Markierung.

[0016] In FIG 3 ist die Lage der Regionen mit Mutationen im Segment gezeigt.

[0017] In FIG 4 ist ein Faltungsvorschlag für das rpo- β -Gensegment gezeigt.

[0018] In FIG 5 ist ein Vergleich zwischen der idealen Situation (stäbchenförmige DNA) mit der realen Situation A (gefaltet) gezeigt. Es wird deutlich, daß die Zugänglichkeit der terminalen Markierung real stark beeinträchtigt ist. Diese Beeinträchtigung wird nach dem Vorgehen gemäß der vorliegenden Erfindung reduziert bzw. vermieden.

[0019] Ein Kern der vorliegenden Erfindung ist die überraschende Beobachtung, daß die beste Diskriminierungsschärfe (Unterscheidung PM gegenüber MM) dann gelingt, wenn die festphasengebundenen Fangsonden komplementär antiparallel zum sense-Strang konzipiert sind, welcher in der PCR ausgehend von einem unmarkierten forward-Primer synthetisiert wird, die Nachweisreaktion aber auf den anti-sense-Strang zugreift, welcher in der PCR ausgehend von einem mit einer nachweisbaren Gruppe markierten reverse-Primer synthetisiert wird, so daß der die Spezifität (Diskriminierungsschärfe) bestimmende Sondenhybridisierungskomplex indirekt über den DNA-Strangreassoziationskomplex nachgewiesen und ggfs. quantifiziert. Umgekehrt kann die Fangsonde auch komplementär zum anti-sense-Strang sein und der Nachweis erfolgt über Reassoziations mit dem via markierten forward-Primer nachweisbaren sense-Strang.

[0020] Dies wirkt sich zwar auch bei Einzelhybridisierungen aus, besonders positiv ist es jedoch im Zusammenhang mit parallel durchgeführten Hybridisierungsassays, d. h. (D)NA probe array testing.

[0021] Unter einem selektiven Nachweis wird ein Nachweis verstanden, der eine Nucleinsäure mit einer Zielsequenz, die sich nur geringfügig von einer Nicht-Zielsequenz unterscheidet, aus einer Probe auswählt und bindet, die eine Vielzahl von Nucleinsäuren enthält, welche die Zielsequenz nicht aufweisen, und unter denen sich auch die Zielsequenz befinden kann oder befindet. Die Bindung findet durch Paarung komplementärer Basen, wie A und T bzw. U sowie G und C, einer Sonde und der nachzuweisenden Nucleinsäure statt. Hierzu ist die Sequenz der Sonde hochgradig komplementär, bevorzugt 100 % komplementär, zu der Zielsequenz auf der Nucleinsäure, insbesondere bezüglich solcher Basen, in denen sich die Zielsequenz von Nicht-Zielsequenzen unterscheidet. Die Sondensequenz ist bevorzugt zwischen 8 und 36 nt, besonders bevorzugt zwischen 16 und 20 nt lang. Die chemische Struktur der Sonde, insbesondere in dem nicht-Nucleobasenteil, z. B. dem sogenannten Backbone, kann relativ frei gewählt werden, vorausgesetzt, die selektive Bindung mit der Zielsequenz ist noch möglich. Neben den (bevorzugten) Oligonucleotiden (als Backbone dient das natürliche oder durch Anknüpfung von Gruppen modifizierte Zucker-Phosphat-Grundgerüst) haben sich in jüngster Zeit auch die sogenannten Peptid-Nucleinsäuren (PNA gemäß WO 92/20702, Backbone aufgebaut unter Einbau von künstlichen Aminosäuren) bewährt. Als Sonden sind auch Moleküle mit gemischten Grundgerüst-Einheiten geeignet (WO 95/14706 oder EP-A-0 672 700).

[0022] Eine Fangsonde, deren Funktion in der sequenzspezifischen Immobilisierung der Reaktionskomplexe an die Festphase besteht, kann beispielsweise dann mit dem Strang des Verlängerungsproduktes binden, der auch mit dem durch Verlängerung des markierten Primers gebildeten Verlängerungsproduktes hybridisieren kann, wenn sie zu einer Sequenz auf diesem Verlängerungsprodukt komplementär ist. Diese Sequenz ist dann die Zielsequenz. Sie ist bei der nachzuweisenden Nucleinsäure entweder bekannt, kann durch Sequenzierung ermittelt werden oder wird erst durch die Bindung an eine oder mehrere Fangsonde(n) gemäß der vorliegenden Erfindung definiert und bestimmt.

[0023] Die Zielsequenz wird bevorzugt so gewählt, daß sie zwischen den aufeinanderzuweisenden "inneren" Enden der Primer liegt. Die Sequenz der Zielsequenz wird so gewählt, daß sie sich von Sequenzen nicht-nachzuweisender Nucleinsäuren unterscheidet, insbesondere in ihrer Basenabfolge. Die Unterschiede können bedingt sein beispielsweise durch Mutationen (Einzel-Basen-Austausche, aber auch mehrere), Deletionen, Insertionen oder Polymorphismen.

[0024] Ein Fachmann kann die geeigneten Zielsequenzen beispielsweise durch Sequenzrecherche und Sequenzvergleich in den bekannten Sequenzdatenbanken auffinden. Im Sinne einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, in der mehrere Sequenzen, Sequenzunterschiede, Mutationen, Polymorphismen oder ähnliches nachgewiesen werden, liegen die Zielsequenzen bevorzugt innerhalb eines Bereiches, der mit Hilfe eines einzigen Primerpaares (ein reverse- und ein forward-Primer) amplifiziert werden kann. Es ist jedoch prinzipiell auch möglich, mehr Primer zu verwenden, insbesondere wenn sie alle zu Amplifikaten führen, die unter anderem die den übrigen Zielsequenzen entsprechende Regionen enthalten. Die nachzuweisende Nucleinsäure kann RNA oder DNA beliebigen Ursprungs sein. Bevorzugt ist es genomische DNA.

[0025] Unter einer zu einer anderen Nucleinsäure oder Sequenz komplementären Nucleinsäure oder Sequenz wird hier eine Nucleinsäure oder Sequenz verstanden, die eine solche ununterbrochene, aufeinanderfolgende Reihe von Basen enthält, die mit einer ununterbrochenen, aufeinanderfolgenden Reihe von Basen der anderen Nucleinsäure oder Sequenz Watson-Crick oder/und Hoogsteen-Basenpaarungen bilden können. Diese Reihe ist bevorzugt länger als 10 Basen.

[0026] Unter einer zu einer anderen Nucleinsäure oder Sequenz homologen Nucleinsäure oder Sequenz wird hier eine Nucleinsäure oder Sequenz verstanden, die zu einer zu der anderen Nucleinsäure komplementären Nucleinsäure oder Sequenz komplementär ist. Dabei werden jeweils ununterbrochene Sequenzen von Basen verglichen.

[0027] Dabei ist es für den Fachmann offensichtlich, daß es neben den natürlich vorkommenden Basen auch künstliche Basen gibt, die sich hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens zu anderen Basen nicht wesentlich von den natürlichen Basen unterscheiden. Für den Fall von Oligonucleotiden als Sonden spricht man auch von Hybridisierung. Die Bedingungen, bei denen eine optimale Hybridisierung stattfindet, sind dem Fachmann vertraut. Beispielsweise richten sich Temperatur, Sondenlänge und Salzgehalt auch nach dem GC-Gehalt der nachzuweisenden Nucleinsäure.

[0028] Das vorliegende Verfahren hat den Vorteil, daß unter sonst gleichen Bedingungen eine höhere Selektivität des Nachweises erreicht werden kann. Umgekehrt kann bei gleichbleibender Selektivität die Stringenz der Prozeßparameter (z. B. Höhe der Wascht Temperatur) erniedrigt werden. Unter Selektivität wird die spezifische Sondenhybridisierung an Nucleinsäuren mit einer exakt komplementären Basensequenz unter Diskriminierung sämtlicher Nucleinsäuren mit nicht exakt komplementärer Sequenz verstanden.

[0029] Proben im Sinne der Erfindung sind Flüssigkeiten, wie Körperflüssigkeiten, Kulturmedien oder Gewebe, bzw. deren Aufbereitungsprodukte, wie Lysate, Extrakte oder Isolate, wie Serum, Plasma und davon abgeleitete Produkte.

[0030] Verfahren zur Amplifikation sind dem Fachmann prinzipiell bekannt. Beispiele sind Amplifikationen wie NASBA (EP-B-0 329 822 oder US-A-5,130,238), LCR (EP-B-0 320 208) und PCR (WO 90/01069). Bevorzugt im Sinne der Erfindung ist jedoch die Amplifikation nach dem PCR-Prinzip (EP-B-0 200 362 bzw. US-A-4,683,202). Hierbei werden mindestens 2 Primer eingesetzt, die bezüglich ihrer Sequenz so ausgewählt werden, daß einer mit einem Strang der nachzuweisenden Nucleinsäure so hybridisieren kann, daß sich mit ihm als Templat nach Einwirkung einer Polymerase und den weiteren hierfür benötigten Reagenzien, wie Puffer, Mononucleosidtriphosphaten etc. unter Verwendung einer downstream vom 3'-Ende des Primers gelegenen Nucleinsäurestückes als Templat ein Verlängerungsprodukt bildet, das wiederum als Templat für die Hybridisierung mit dem und Verlängerung des anderen Primers dienen kann. Je selektiver die Primer an die Nucleinsäure bzw. deren Gegenstrang binden, desto selektiver wird schon die Amplifikation. Durch mehrfache Ausführung der Reaktionsschritte Hybridisierung eines Primers mit seinem Templat, Verlängerung des Primers und Trennung des Verlängerungsproduktes von seinem Templat ist es möglich, eine Vielzahl von Kopien des zwischen den äußeren Enden der Primer gelegenen Nucleinsäurestückes, welches die Zielsequenz(en) enthält, herzustellen.

[0031] Unter einem forward-Primer wird ein Primer verstanden, der mit einer Sequenz des nachzuweisenden Nucleinsäurestranges hybridisieren kann bzw. hybridisiert. Der Strang kann ausgewählt werden aus einem der beiden Stränge eines Doppelstranges, kann aber auch eine selbst schon einzelsträngige Nucleinsäure, z. B. RNA, bevorzugt mRNA oder rRNA, sein. Der reverse-Primer ist ein Primer, der mit dem aus dem forward-Primer gebildeten Verlängerungsprodukt hybridisieren kann bzw. hybridisiert.

[0032] Bei dem forward-Primer handelt es sich bevorzugt um einen Primer, der mit dem anti-sense-Strang der nach-

zuweisenden Nucleinsäure hybridisieren kann, der reverse-Primer mit dem sense-Strang. Aus dem forward-Primer bildet sich somit ein sense-Verlängerungsprodukt (sense-Tochterstrang), FIG 1.

[0033] Neben einer auf die Primerbindungsstelle gerichteten Sequenz können die Primer auch weitere Sequenzen, die nicht direkt mit der nachzuweisenden Nucleinsäure hybridisieren können, enthalten, z. B. oligo T-Enden, die bevorzugt am 5'-Ende als Abstandshalter zu einer Markierung dienen. Auch die Fangsonden können so modifiziert sein.

[0034] Übliche Primer haben eine Länge von zwischen 12 und 30 Nucleotiden/Basen. Diese sind bei der vorliegenden Erfindung beide einbezogen in den darauffolgenden Nachweis, welcher ein Zeichen für die Anwesenheit (qualitativer Nachweis) oder die Menge (quantitativer Nachweis) der Analytnucleinsäure ist.

[0035] Im Sinne der Erfindung ist mindestens einer, bevorzugt jedoch nur einer der Primer, ausgewählt aus der Gruppe der forward- und der reverse-Primer, besonders bevorzugt der reverse, nachweisbar markiert. Unter einer Markierung wird eine chemische Gruppe verstanden, die sich in ihren Eigenschaften von denen von Nucleinsäuren detektierbar unterscheidet. Eine solche Eigenschaft kann z. B. eine Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge, Fluoreszenz, Streuung, Reflektion oder Bindefähigkeit zu anderen Substanzen sein. Man kann sie auch in direkte und indirekte Markierungen trennen. Direkte Markierungen können ohne Zusatz weiterer Bindekomponenten aufgrund ihrer signalerzeugenden Eigenschaft nachgewiesen werden. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise Enzyme, wie alkalische Phosphatase oder Peroxidase (POD), die durch Verfolgung der enzymkatalysierten Umsetzung eines Farbsubstrats nachgewiesen werden können. Gruppen, die diese Bedingungen erfüllen, sind jedoch im Sinne der Erfindung nur dann bevorzugt, wenn das Substrat in der Nähe des Komplexes während der Messung verbleibt, z. B. wie bei Äquorin. Hierzu zählen jedoch auch die aufgrund ihres spektralen Verhaltens nachweisbaren, signalgebenden Gruppen, wie Fluoreszeine.

[0036] Indirekte Markierungen sind solche, die noch eine Bindung an ein weiteres Reagenz benötigen, das eine hiermit bindefähige Komponente enthält, welches dann wiederum direkt oder indirekt markiert sein kann. Zu diesen Gruppen zählen beispielsweise Haptene, wie Biotin oder Digoxigenin. Sie können durch Umsetzung mit einem Nachweisreagenz enthaltend ihre Bindepartner, z. B. Streptavidin bzw. einen Antikörper, nachgewiesen werden; dazu sind diese durch eine signalgebende oder signalvermittelnde Gruppe, z. B. durch Äquorin oder einen Fluorophor, markiert. Besonders bevorzugt als signalgebende Gruppe sind partikuläre Komponenten, z. B. Beads oder Microsphären aus Latex, die einen nachweisbaren Farbstoff beinhalten. Die Erfindung wirkt sich besonders positiv aus bei Partikeln einer großen Größe, die wegen der in FIG 5 gezeigten sterischen Situation real nicht an die Markierung (dort Digoxigenin) binden kann, wenn nicht die stranginterne Reassoziations ausgeschaltet wird. Die Markierung ist natürlich zweckmäßigerweise so an dem Primer angebracht, daß sie die Hybridisierung und Verlängerung des Primers möglichst wenig behindert. Bevorzugt ist dabei die Anbringung am 5'-Ende im Falle eines Oligonucleotides, z. B. während der chemischen Synthese, unter Verwendung eines mit der Markierungsgruppe derivatisierten Phosphoramidites. Die Markierung kann jedoch auch an einer Base angebracht sein (WO 93/05060). Im Falle von PNA wird die Markierung bevorzugt am Aminoende angebracht (WO 92/20703).

[0037] Unter einer Fangsonde wird eine Nucleinsäure bindende Einheit verstanden, die eines der durch Amplifikation hergestellten Nucleinsäurestränge (Verlängerungsprodukte) selektiv binden kann und entweder an eine Festphase gebunden werden kann (immobilisierbar) oder gebunden ist (immobilisiert). Unter direkter Bindung wird in diesem Zusammenhang die Bindung zweier Basen mit Hilfe von Wasserstoffbrücken verstanden. Die Bindung an eine Festphase kann kovalent oder nicht-kovalent sein. Kovalente Bindungen können entweder gewährleistet werden durch Phosphodiesterbindungen (EP-B-0 386 229) und Amidbindungen (EP-B-0 562 025 oder US-A-5,242,974) aber auch durch Aktivierung photosensitiver Reste (z. B. Diazogruppen) und Inkontaktbringen mit einer Lösung in eine Sonde, die eine reaktive Gruppe (z. B. PCT/EP 96/00893) enthält.

[0038] Nicht-kovalente Bindungen sind beispielsweise biospezifische Bindungen, wie enthalten in den Wechselwirkungspaaren (Strept)avidin-Biotin, Hapten-Antikörper, Vitamin-Rezeptor etc.. Bevorzugt ist die Fangsonde biotin-markiert, z. B. über eine 5'-Phosphatgruppe mit Hilfe eines Aminoalkyl-Linkers und die Festphase ist Streptavidin-überzogen. Besonders bevorzugt ist die Fangsonde jedoch schon vor Inkontaktbringen mit der Reaktionsmischung aus der Amplifikation kovalent oder über eine stabile biospezifische Bindung (z. B. (Strept)Avidin-Biotin) an die Festphase gebunden. Die Konstitution der Festphase ist für die vorliegende Erfindung nicht wesentlich. Sie sollte jedoch in der Amplifikationsmischung unlöslich sein. Besonders geeignet sind z. B. Phasen aus Kunststoffen mit oder ohne metallischen Anteil, z. B. in Form von Perlen, aber auch eines porösen Vlieses oder eines mehr oder weniger flachen, nicht-porösen Testträgers. Wesentliche Eigenschaft des Trägers ist die Darstellung eines Ortes, an welchen die Fangsonden gebunden sind oder werden können, und woran dann im Falle der Anwesenheit, die nachzuweisende Nucleinsäure binden kann. Bevorzugt wird nicht gleichzeitig zu einer Fangsonde mit einer bestimmten Sequenz auch eine Fangsonde eingesetzt, die zu 100 % komplementär zu der Fangsonde ist.

[0039] Eine besondere Ausführungsform der Erfindung ist auf den potentiellen (Mehrfach)Nachweis einer Mehrzahl von Nucleinsäuren unterschiedlicher Sequenz gerichtet. Dies kann dadurch geschehen, daß für jede nachzuweisende Nucleinsäure bzw. Sequenz eine gerade hierfür selektive Fangsonde eingesetzt wird. Die Fangsonden können zwar an unterschiedliche Festphasen gebunden sein, besonders bevorzugt an unterschiedlichen Stellen, besonders bevorzugt

an definierte und meßtechnisch unterscheidbare geometrische Orte auf derselben Festphase gebunden sein, bevorzugt nach Art der Nucleinsäurearrays, wie beispielsweise beschrieben in WO 92/10588. Hierbei können bestimmte geometrische Muster gewählt werden, z. B. rechteckige, hexagonale oder kreuzförmige Matrices, die die Auswertung erleichtern. Damit können ganze Cluster von Zielsequenzen bezüglich ihrer Anwesenheit bzw. Abwesenheit in einer Probe untersucht werden. Die vorliegende Erfindung benutzt die Bildung eines Bindekomplexes (Hybrides), welches sowohl das Verlängerungsprodukt des reverse- als auch des forward-Primers als auch die Fangsonde enthält. Hierbei wird im Folgenden von dem Verlängerungsprodukt als forward-Verlängerungsprodukt gesprochen, welches durch Verlängerung des forward-Primers gebildet wurde. In den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren wurden nicht die Bedingungen eingehalten, die für die meßbare Bildung eines solchen Hybrides erforderlich sind. Generell ist die Bildung eines solchen Komplexes bevorzugt, wenn der Fangsonde ausreichend Gelegenheit zur Hybridisierung mit einem Strang des Amplifikates gegeben wird, bevor dieser mit seinem (Amplifikat-)Gegenstrang unter Bildung eines (Re-)assoziationsproduktes hybridisieren kann. Geschieht dies nicht, kann die Fangsonde gerade bei zu starker stranginterner Hybridbildung neigender nachzuweisender Nucleinsäuren nicht mehr mit dem gewünschten Verlängerungsprodukt hybridisieren und ein Nachweis ist erschwert oder unmöglich gemacht, da die Signalstärke dann recht gering ist.

[0040] Dies kann folgendermaßen erreicht werden; eine geeignete Menge an Hybridisierungslösung sowie ein Aliquot aus dem Reaktionsgemisch aus der Amplifikation, in welchem als Doppelstränge vorliegende Verlängerungsprodukte durch Basendenaturierung einzelsträngig gemacht wurden, werden jeweils getrennt oder/und nacheinander in eine Pipette, bevorzugt in dieselbe Pipette, physikalisch voneinander getrennt (so daß eine Vermischung in der Pipette im wesentlichen ausgeschlossen ist) aufgenommen und dann in ein Gefäß ausgestoßen, welches die Festphase enthält.

[0041] In einer bevorzugten Ausführungsform wird zuerst die Hybridisierungslösung, dann eine Luftblase und dann das Reaktionsgemisch in eine Pipette oder eine Nadel aufgesaugt, so daß sich die beiden Flüssigkeiten möglichst nicht vermischen. Dann werden die beiden Flüssigkeiten schnell, d. h. innerhalb eines Zeitraumes von weniger als 5 sec., bevorzugt weniger als 1 sec. in ein Gefäß ausgestoßen, welche die Fangsonde enthält. Eine rasche Vermischung wird insbesondere erreicht durch die Schnelligkeit des Ausstoßes und gewünschtenfalls durch wiederholtes Aufnehmen und Ausstoßen der Flüssigkeit in die und aus der Pipette. Die Schnelligkeit des Ausstoßes muß hierbei der Geometrie des Reaktionsgefäßes angepaßt sein, z. B. um Verspritzungen zu vermeiden. Durch eine rasche Vermischung ist gewährleistet, daß die Hybridisierung eines Stranges des Verlängerungsproduktes mit einer Fangsonde praktisch gleichzeitig vonstattengehen kann, wie die Hybridisierung mit dem Gegenstrang oder stranginterne Hybridisierung. Der Startzeitpunkt für die Hybridisierung wird mit t_0 bezeichnet und ist der Zeitpunkt, bei dem Reaktionsbedingungen eingestellt sind, die eine Hybridisierung erlauben.

[0042] Bezüglich der Inkubations-Temperatur ist es bevorzugt, eine solche zu wählen, bei der die Fangsonde mit dem sense-Strang hybridisieren kann, bevorzugt $\geq 5^\circ\text{C}$ unterhalb des Schmelzpunktes dieses Hybrids und $\geq 2^\circ\text{C}$ oberhalb des Gefrierpunktes der Mischung.

[0043] Die Inkubation der Sonde(n) mit dem Reaktionsgemisch findet bevorzugt zwischen 45 und 180 min statt. Anschließend wird der nicht an die Festphase gebundene Anteil von Primern (insbesondere des markierten Primers) sowie von markierten Amplifikationsprodukten von der Festphase abgetrennt, so daß nicht selektiv gebundene, d. h. überschüssige, Markierung, die Bestimmung des selektiv gebundenen Anteils nicht wesentlich stört. Dies kann durch Abpipettieren der Flüssigkeit, gewünschtenfalls unterstützt durch einen oder mehrere Waschschrte, geschehen.

[0044] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Hybridisierungsbedingungen während der Inkubation der Fangsonde mit den Amplifikaten relativ unstringent gewählt, d. h. so, daß noch keine selektive Hybridisierung stattfindet, sondern relativ viel Nucleinsäure relativ unselektiv gebunden wird. In einem oder mehreren der nachfolgenden Waschschrte hingegen werden relativ stringente Hybridisierungsbedingungen gewählt. Dabei lösen sich die Hybride wieder auf, in denen die Fangsonde relativ wenig komplementär zur Zielsequenz ist, während die strenger komplementären Hybride gebunden bleiben.

[0045] Dazu wird der Waschpuffer bevorzugt folgendermaßen ausgesucht. Er enthält 2 bis 5 mol/l TMAC, 0.1 — 5 mmol/l eines Chelatbildners (z. B. EDTA), 0.1 bis 5 Gew.% eines bevorzugt anionischen Detergenz sowie 1 bis 100 mM einer organischen Pufferbasis.

[0046] Das vorliegende Verfahren eignet sich besonders für Nachweise von Mutationen, insbesondere komplexen Mustern, z. B. bei Resistenzen von Organismen, wie gegen Antibiotika oder Polymorphismen, wie bei p53. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß es besonders selektiv ist, d. h. besonders gut zwischen sehr ähnlichen Nucleinsäuresequenzen unterscheiden bzw. diskriminieren kann.

[0047] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Probe, z. B. ein Serum, mit Hilfe von Reagenzien so behandelt, daß die nachzuweisenden Nucleinsäuren in für die Hybridisierung zugänglicher Form vorliegen. Dies kann beispielsweise geschehen durch Zusatz von Reagenzien, die Zellwände von Organismen, z. B. Viren oder Bakterien, lysieren. Falls gewünscht können die Nucleinsäuren vorgereinigt werden, z. B. durch Immobilisierung an einer Festphase, wie an Glaspartikeln unter Zusatz von chaotropen Salzen. Solche Vorreinigungen sind beispielsweise beschrieben in EP-A-0 389 063 oder US-A-5,234,809. Die nucleinsäurehaltige Lösung wird nun einer Nucleinsäureamplifikation durch

PCR unterzogen, wobei der reverse-Primer mit einer nachweisbaren Gruppe markiert ist, der forward-Primer nicht. Der zwischen den Primern liegende Bereich der nachzuweisenden Nucleinsäure ist derjenige, der die Zielsequenz enthält. Die amplifikathaltige Lösung wird gleichzeitig mit einer Hybridisierungslösung in ein flaches Reaktionsgefäß gegeben, an dessen Oberfläche in diskreten Bereichen Fangsonden unterschiedlicher Sequenz gebunden sind, wobei die Fangsonden komplementär zu jeweils einer Zielsequenz auf dem unmarkierten sense-Strang einer der nachzuweisenden Nucleinsäure sind. Sind umgekehrt die Fangsonden antiparallelkomplementär zum anti-sense Strang konzipiert, wird entsprechend der forward-Primer in markierter Form eingesetzt.

[0048] Dabei bilden sich erfindungsgemäß die gewünschten Hybride aus der Fangsonde und den beiden Strängen, sofern die nachzuweisende Nucleinsäure in der ursprünglichen Probe enthalten war. Die Bildung der Hybride kann über die eingebaute Markierung in den Amplifikaten nachgewiesen werden, z. B. direkt über ein (Fluoreszenz-)Mikroskop. Bei indirekten Markierungen, z. B. durch ein Hapten, wird zunächst mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten umgesetzt, so daß der Antikörper und somit die (zweite) Markierung an die (erste) Markierung bindet. Danach ist die Messung der (zweiten) Markierung möglich.

[0049] Die Auswertung der Messung geschieht dahingehend, daß festgestellt wird, an welchen Stellen eine Markierung gemessen wird. Die zu der dort gebundenen (bekannten) Sequenz der Fangsonde komplementäre Sequenz ist dann in der Probe vorhanden. Üblicherweise wird bei der Entscheidung, ob das gemessene Signal als positiv zu werten ist, ein Schwellenwert definiert, oberhalb dessen angenommen wird, daß die Nucleinsäure vorhanden war. Da die Meßsignale für unterschiedliche Sequenzen und Ähnlichkeiten schwanken können, die Meßempfindlichkeit jedoch meist so hoch ist, daß auch Hintergrundsignale als Signal gewertet werden könnten, ist die durch die vorliegende Erfindung erreichbare höhere Diskriminierung außerordentlich wichtig, um falsche Auswertungen zu vermeiden. Es kann sehr viel besser zwischen den Signalen bei Anwesenheit und Abwesenheit der Zielsequenz differenziert werden.

[0050] Bei solchen Vielfachtests ist es einerseits möglich, verschiedenste Analyten, z. B. Viren, wie HBV, HGV, HCV und HIV, miteinander unter Verwendung verschiedener Primerpaare zu detektieren, oder Teilsequenzen einer bestimmten Nucleinsäure, z. B. Polymorphismen auf menschlichen Genomen, nachzuweisen, jedoch ist es auch möglich, Sequenzen nach dem "Sequencing-by-hybridization"-(SBH)-Verfahren zu sequenzieren, entweder de-novo (bisher lang unbekannte Sequenzen) oder auch zum Auffinden von Abweichungen von einer normalen Sequenz. Ein SBH-Verfahren ist beispielsweise beschrieben in Khrapko et al., FEBS Letters 250, 118 — 122 (1989) oder Khrapko et al., J. DNA Sequencing and Mapping 1, 375 — 388 (1991). Dazu werden üblicherweise Fangsonden ungefähr gleicher Länge verwendet, deren Sequenzen so überlappen, daß sie am einen Ende kürzer und am anderen Ende länger sind als die nächstähnliche Sequenz. Umgekehrt gilt für jede weitere Sequenz, daß sie in unveränderter Richtung am einen Ende länger, aber am anderen kürzer ist. Der so gebildete Versatz beträgt, je nach Bedürfnissen, zwischen 1 und 5 Nucleotiden. Die Sequenz der zu sequenzierenden Nucleinsäuren kann durch Zusammensetzen der erhaltenen Hybridisierungsinformationen ermittelt werden.

[0051] Für die Mutationsanalyse können allel- oder mutationsspezifische Fangsonden eingesetzt werden.

[0052] Ebenfalls Gegenstand ist daher ein Verfahren zum selektiven Nachweis einer Nucleinsäure enthaltend die Schritte Amplifikation der Nucleinsäure oder eines Teils davon mit Hilfe zweier Primer, von denen einer mit einem Strang der nachzuweisenden Nucleinsäure und der andere mit einem hierzu komplementären Strang hybridisieren kann und von denen mindestens einer eine nachweisbare Markierung gebunden enthält, unter Bildung jeweils eines Verlängerungsproduktes dieser Primer in einer Reaktionsmischung, Bindung einer Fangsonde an eines dieser Verlängerungsprodukte unter Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes, der die Fangsonde und mindestens dieses Verlängerungsprodukt enthält, Abtrennung des an die Fangsonde gebundenen Verlängerungsproduktes von nicht gebundenen Anteilen der Reaktionsmischung, und Bestimmung der an die Fangsonde gebundenen nachweisbaren Markierung, dadurch gekennzeichnet, daß die Fangsonde so gewählt wird, daß sie mit dem Strang des Verlängerungsproduktes binden kann, der auch mit dem durch Verlängerung des markierten Primers gebildeten Verlängerungsprodukt hybridisieren kann.

[0053] Ebenfalls Gegenstand ist ein Reagenzkit zum Nachweis von Nucleinsäuren enthaltend in getrennten Behältern mindestens einen Primer, der eine nachweisbare Markierung gebunden enthält, zur Amplifikation der Nucleinsäuren oder Teilen davon, mindestens 2 Fangsonden unterschiedlicher Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer so gewählt wird, daß er mit demselben Strang des Verlängerungsproduktes hybridisieren kann wie die Fangsonden.

[0054] Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Reagenzienkits, enthaltend mindestens einen nachweisbar markierten Primer und mindestens 2 Fangsonden mit unterschiedlicher Sequenz, wobei der mindestens eine nachweisbar markierte Primer so gewählt wird, daß er mit demselben Strang jeder Zielnucleinsäure hybridisieren kann wie die Fangsonden, bei der Mutationsanalyse.

[0055] Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert:

Beispiele

Beispiel 1

5 Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis*

A. Probenvorbereitung und Amplifikation

10 [0056] In *E. coli* klonierte DNA-Plasmidstandards, die das Gen für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase (*rpo- β*) von *Mycobacterium tuberculosis* enthalten (Wildtyp WT und Mutanten MX), wurden nach Zellyse isoliert und über Qia-gen-Säulchen gereinigt. Das für Rifampicin-Resistenz relevante *rpo- β* -Gensegment wurde via PCR amplifiziert, wobei wahlweise der forward- oder der reverse-Primer am 5'-Ende eine DIG-Markierung trug. Die Primer-Oligonucleotide wurden gemäß Standard-Phosphoramiditchemie synthetisiert (Caruthers, M.H., Barone A.D., Beaucage, S.L., Dodds, D.R., Fisher, E.F., McBride, L.J., Matteucci, M., Stabinsky, Z., Tang, J.Y., Chemical synthesis of deoxyribonucleotides, 15 *Methods in Enzymology* 154, 287-313 (1987)) und ggfs. 5'-terminal funktionalisiert via Einbau von [N-Trifluoroacet-amido-(3-oxa)pentyl-N,N-diisopropyl-methyl-phosphoramidit (Firma Boehringer Mannheim GmbH (BM), Best. Nr. 1480863), nachfolgender basische Abspaltung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe mit wässrigem Ammoniak und Umsetzung mit Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-6-amidocaproyl-NHS-ester (Firma BM, Best Nr. 1333054).

20 [0057] Das PCR-Temperaturprofil, gefahren auf einem Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 mit Einsatz von 1 μ l gereinigtem Zellextrakt pro 100 μ l PCR Reaktionslösung, lautete:

Initiation 3' 94°C; 10 Zyklen 15" 95°C / 30" 68°C / 30" 72°C; 20 Zyklen 15" 94°C / 30" 68°C / 30" + zusätzlich 20" mit jedem neuen Zyklus bei 72°C; 5' 70°C. Äquilibration $\geq 30'$ 4°C

25 PCR Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3, Primer (jeweils forward und reverse, siehe unten) Polymerase und dNTPs gemäß PCR Core Kit (BM, Kat. Nr. 1578553).

PCR-Primer (R = reverse; F = forward):

30 Primer 55 F: 5'-TCG CCG CGA TCA AGG AGT-3' (SEQ.ID.NO. 1)

Primer 55 R: 5'-TGC ACG TCG CGG ACC TCC A-3' (SEQ.ID.NO.2)

Primer 56 F : 5'- DIG-TCG CCG CGA TCA AGG AGT-3' (SEQ.ID.NO.3)

35 Primer 56 R : 5'- DIG-TGC ACG TCG CGG ACC TCC A-3' (SEQ.ID.NO.4)

MTB *rpo- β* -Amplicon (sense-Strang; 157 nt):

40 5'- TCG CCG CGA TCA AGG AGT TCT TCG GCA CCA GCC AGC TGA GCC AAT TCA TGG ACC AGA ACA ACC CGC TGT CGG GGT TGA CCC ACA AGC GCC GAC TGT CGG CGC TGG GGC CCG GCG GTC TGT CAC GTG AGC GTG CCG GGC TGG AGG TCC GCG ACG TGC A-3' (SEQ.ID.NO.5)

45 [0058] Amplifizierte Plasmidstandards, Wildtyp (WT) oder Mutanten (MX), wurden nach Kontrolle über Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Anfärbung aliquotiert und bis zur Benutzung tiefgefroren aufbewahrt.

B) Denaturierung der Amplifikate

50 [0059] Es werden zunächst 5 μ l Lösung des DIG-markierten Amplifikates und 5 μ l einer stark basischen Denaturierungslösung (50 mM NaOH, 2 mM EDTA) in einem inerten Reaktionsgefäß (z. B. von der Fa. Eppendorf) gemischt und ≥ 10 min bei RT inkubiert.

C) Herstellung des Disposables

55 [0060] Fangsonden, komplementär antiparallel zum sense-Amplicon-Strang, wurden ebenfalls gemäß Standard-Phosphoramiditchemie als 18-mere mit 5'-terminaler Biotinylierung synthetisiert. Die Biotin-Gruppe wurde direkt bei der Synthese eingebaut mittels eines Biotinoyl-6-amidohexyl-N,N-diisopropyl- β -cyanoethyl-phosphoramidits, bei dem der reaktive imidazolyl-Stickstoff Dimethoxytrityl-geschützt ist (Firma Perkin-Elmer ABI, Nr. 401396).

[0061] c = komplementär zum sense-Strang; S = sensitiv (auf Rifampicin-Behandlung (= den Wildtyp erfassende Sonden); R = resistent gegenüber Rifampicin-Behandlung (= diverse Mutanten erfassende Sonden)

cS1-18/2-BIO 5'-BIO-T₂₀-ATT GGC TCA GCT GGC TGG-3' (Tab. 4) SEQ.ID.NO.6

cR1a-18-BIO 5'-BIO-T₂₀-TTG GCT CGG CTG GCT GGT-3' (Tab. 4) SEQ.ID.NO.7

cS2-18-BIO 5'-BIO-T₂₀-GTT GTT CTG GTC CAT GAA-3' (Tab. 4) SEQ.ID.NO.8

cR2-18-BIO 5'-BIO-T₂₀-GTT GTT CTG GAG CAT GAA-3' (Tab. 4) SEQ.ID.NO.9

cS3-18/1-BIO 5'-BIO-T₂₀-CAA CCC CGA CAG CGG GTT-3' (Tab.1-3) SEQ.ID.NO.10

cS3-18/2-BIO 5'-BIO-T₂₀-TCA ACC CCG ACA GCG GGT-3' (Tab.4) SEQ.ID.NO.11

cS4-18-BIO 5'-BIO-T₂₀-TCG GCG CTT GTG GGT CAA-3' SEQ.ID.NO.12

cR4a-18-BIO 5'-BIO-T₂₀- TCG GCG CTT GTA GGT CAA-3' SEQ.ID.NO 13

cR4b-18-BIO 5'-BIO-T₂₀- TCG GCG CTT GTC GGT CAA-3' SEQ.ID.NO 14

cdS4-18-BIO 5'-BIO-T₂₀- TCG GCG CTT GCG GGT CAA-3' (Tab. 4) SEQ.ID.NO.15

cS5-18-BIO 5'-BIO-T₂₀-CCC CAG CGC CGA CAG TCG-3' SEQ.ID.NO 16

cR5-18-BIO 5'-BIO-T₂₀-CCC CAG CGC CAA CAG TCG-3' (Tab. 4) SEQ.ID.NO. 17

MBD

5'-BIO- T₂₅-Y-T-3' (Tab. 4) SEQ.ID.NO.18

|

DIG

BIO = Monobiotinylierung via on-line-Einbau von Biotinoyl-6-amidohexyl-phosphor-amidit

Y = on-line-Einbau von 3-Trifluoacetamido-1,2-propandiol-phosphoramidit, nachfolgend basische Entblockung, Verlängerung mit 6-Aminocaprinsäure NHS-Ester und Markierung über Umsetzung mit DIG-3-O-carboxymethyl-NHS-ester (basenstabil) (siehe oben).

[0062] Als Disposables dienten mit schwarzem Kohlenstoffpigment eingefärbte Polystyrol-Disposables (DE-19707204.6) mit einer Vertiefung der Maße 0.7 cm (rund, Durchmesser) x 0.15 cm (tief), die mit einer thermoRSA-Biotin / Streptavidin-Schicht aktiviert wurden (PCT/EP 89/00195). Biotin-funktionalisierte Fangsonden wurden darauf durch einen Inkjet Printing-Prozeß analog EP-A-0 268 237 immobilisiert. Jede Düse des Druckkopfes wurde jeweils mit einer Fangsonden-Lösung anderer Spezifität befüllt, so kleine, voneinander isolierte, kreisrunde Reaktionsfelder mit einem Durchmesser von ca. 100 µm in geometrischen Mustern auf den Testträger gedruckt, getrocknet und damit ein Array verschiedener Fangsonden generiert (C2a-Festphase).

[0063] Drucklösung (inkjet printing solution): 5 mM Mes/5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% (w/v) Saccharose, 0.5 mg/ml RSA-Res (dialysiert), Sonden-Konzentration 1 µM.

D) Sondenhybridisierung

[0064] Danach wird z. B. mit einem Hamilton MicroLab-Dispenser nacheinander, und durch eine Luftblase getrennt, 40 µl Hybridisierungs- (= Neutralisations-)Puffer und 10 µl denaturiertes PCR-Amplifikat aufgezogen, und anschlie-

Beim Druckvoll in einem Schritt ins Disposable dispensiert, so daß eine rasche Vermischung eintritt und ein identisches t_0 für alle Hybridisierungsereignisse vorliegt. Die Mischung wurde für 90 min bei Raumtemperatur (Tabellen 1 bis 3) inkubiert, bzw. 37 °C (Tabelle 4), mit (Tabellen 1 bis 3) bzw. ohne (Tabelle 4) Schütteln (E. Bühler Swip, 250 rpm, linear).

5 Hybridisierungspuffer:

[0065] 10 mM Tris/HCl, 4 M TMAC (Tetramethylammonium-chlorid), 1 mM EDTA, 0.1 % Tween-20 [in Bsp.4: Zwittergent 3-12] (w/v), 0.013% Oxypyrion, 0.01 % Methylisothiazolon, pH 6,3.

10 E) Waschschrift

[0066] Zuerst 20 sec b/f-Trennung bei 59 (61)°C (eingestellte Solltemperatur an der manuellen DNA-Waschvorrichtung) bzw. 60°C (Isttemperatur am semiautomatischen Inkubator/Schüttler/Waschmodul) mit Waschlösung 1 (Flußrate 14.4 bzw 12 ml/min); sofort hinterher 20 sec mit salzarmem Waschpuffer bei RT nachwaschen (Waschlösung 2, Flußrate 12 ml/min).

Waschlösung 1(für Stringenz-Waschschrift nach Hybridisierung):

[0067]

20 10 mM Tris/HCl, 4 M TMAC, 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20 [in Tab.4: Zwittergent 3-12] (w/v), 0.013 % Oxypyrion, 0.01 % Methylisothiazolon, pH 8.0.

[0068] Waschlösung 2 (zum Nachwaschen bei der bound/free-Trennung nach Hybridisierung, sowie zur bound/free-Trennung nach Konjugatreaktion):

15 mM NaCl / 1.5 mM Na₃-Citrat / 0.1 % SDS-Lösung, pH 7.0

30 F) Konjugatbindung

[0069] 30 µl Konjugatsuspension (anti-DIG-funktionalisierte Fluorobeads in stabiler Suspension 0.01 Gew. %) wurden in die Mulde pipettiert und die Mischung 30 min bei Raumtemperatur (60 min, 37 °C in Tabelle 3) inkubiert. Für die abschließende DIG : Anti-DIG-Immunreaktion mit Schütteln (E. Bühler Swip, 250 rpm, linear) (Tabellen 1 bis 3) bzw. ohne (Tabelle 4).

35 [0070] Anschließend wurde 8 sec mit salzarmem Waschpuffer (Waschlösung 2) bei RT und einer Flußrate von 12 ml/min gewaschen.

Konjugatsuspension:

40 [0071] MAK(DIG)(IgG)-110 nm COOH-Latex-Fluorobead-Suspension (hergestellt aus BM-Biochemicals Beads, Kat. Nr. 1742582, verwendet gemäß US-A-5,516,635) 0.1% Gew.-solids wird hergestellt durch Anlösen eines Fläschchens Konjugat-Lyophilisat mit 200 µl Aqua bidest, Zubereitung von Tagesbedürfnissen durch 1:10-Verdünnung auf 0.01 % solids in Konjugatpuffer.

45 Konjugatpuffer:

[0072] 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 0.5 % RPLA-IV, 10 µg/ml M-IgG-1(poly-Fab, BM, Biochemicals for the Diagnostic Industry, Kat. Nr. 1368388), 10 µg/ml M-IgG-2a(poly-Fab, BM, Biochemicals for the Diagnostic Industry, Kat. Nr. 1866729), 0.05 % (w/v) Tween-20, 0.095 % NaN₃.

50 G) Messung der gebundenen Fluoreszenz und Auswertung

[0073] Detektion geschah mit einem Mikroskop/CCD-Kamera-Aufbau von der Firma. Leica (Heidelberg, BRD).

55 [0074] In den Tabellen 1-3 sind Meßergebnisse zusammengestellt, die mit dem anfänglichen 5X (5 Sonden) Array bei vergleichender Bewertung von F- (= via forward-Primer markierte sense-Stränge) und R- (= via reverse-Primer markierte anti-sense-Stränge) Amplicons unter manueller Testführung erbracht wurden. Variiert wurden die Waschtemperatur im Stringenzwaschschrift nach Hybridisierung sowie Inkubationstemperatur bzw. -zeit für die Konjugatreaktion.

Tabelle 1 5X Array

Charakteristik: waschen mit Waschpuffer 1; 59°C, (20sec Waschpufferzufuhr)
Konjugat 30min schütteln/RT

Ergebnisse:

Festphase mit verschiedenen Sonden in getrennten Spots										
Probe	cS3	VK(2)	cS4	VK(2)	cR4a	VK(2)	cR4b	VK(2)	cS5	VK(2)
R-WT	168	12,5%	4267	7,3%	94	9,8%	44	8,6%	1838	6,1%
R-dS4	121	13,6%	95	34,4%	29	9,5%			2309	12,5%
R-R4a	236	15,3%	321	22,8%	7870	5,9%	130	5,8%	4346	4,2%
R-R4b	147	15,5%	118	8,1%	199	8,4%	3374	4,8%	6383	3,5%
R-R5	133	14,0%	5368	13,0%	72	10,3%	38	7,3%	165	6,3%
F-/R-WT	440	7,1%	5642	8,8%	145	12,0%	65	10,3%	4002	9,8%
F-WT	296	13,8%	4570	22,9%	117	23,1%	57	19,6%	3833	19,1%
F-dS4	382	5,5%	237	22,3%	45	8,1%	43	5,0%	5792	10,6%
F-R4a	272	12,6%	419	4,8%	5357	2,7%	89	5,8%	5375	1,4%
F-R4b	258	12,3%	103	21,6%	260	22,1%	2601	21,9%	7805	15,8%
F-R5	533	4,9%	7850	8,8%	109	7,8%	54	6,6%	631	10,8%

Festphase				
Probe	cS4	cR4a	cR4b	cS5
R-WT	100,0%	2,2%	1,0%	ca. 72xBG
R-dS4	2,2%	0,7%	0,5%	
R-R4a	4,1%	100,0%	1,7%	
R-R4b	3,5%	5,9%	100,0%	
R-R5	100,0%	1,3%	0,7%	ca. 0.09xWT
F-/R-WT	100,0%	2,6%	1,1%	ca. 125xBG
F-WT	100,0%	2,6%	1,2%	ca. 100xBG
F-dS4	5,2%	1,0%	0,9%	
F-R4a	7,8%	100,0%	1,7%	
F-R4b	4,0%	10,0%	100,0%	
F-R5	100,0%	1,4%	0,7%	ca. 0.19xWT

Die grau hinterlegten Felder kennzeichnen ein Hybridisierungsereignis mit einer exakt komplementären Sonde.

Tabelle 2 5X Array

Charakteristik: waschen mit Waschpuffer 1; 61°C, (20sec Waschpufferzufuhr)
30min schütteln/RT

Festphase mit verschiedenen Sonden in getrennten Spots										
Probe	cS3	VK(2)	cS4	VK(2)	cR4a	VK(2)	cR4b	VK(2)	cS5	VK(2)
R-WT	300	16,5%	5863	9,3%	140	18,5%	62	12,2%	3281	3,2%
R-dS4	175	9,2%	215	15,4%	32	9,1%	30	8,9%	3813	8,0%
R-R4a	242	19,7%	423	7,6%	3493	7,6%	136	13,7%	5088	5,7%
R-R4b	189	15,5%	154	18,1%	238	13,7%	1510	4,7%	8192	2,8%
R-R5	121	26,0%	5826	12,8%	77	10,5%	37	8,4%	127	7,0%
F-/R-WT	206	19,3%	3552	8,2%	115	8,3%	52	9,4%	4046	10,1%
F-WT	107	14,8%	2152	7,2%	87	10,0%	44	6,8%	3428	3,3%
F-dS4	135	14,6%	167	6,8%	39	9,5%	42	4,7%	6959	6,5%
F-R4a	104	9,5%	349	13,0%	3199	4,6%	76	6,6%	7290	6,5%
F-R4b	62	13,3%	85	32,8%	155	27,2%	1888	22,1%	8038	12,8%
F-R5	158	22,8%	7286	5,7%	108	4,7%	45	6,0%	256	10,4%

Festphase				
Probe	cS4	cR4a	cR4b	cS5
R-WT	100,0%	2,4%	1,1%	ca. 150xBG
R-dS4	3,7%	0,5%	0,5%	
R-R4a	5,0%	100,0%	1,6%	
R-R4b	1,8%	5,3%	100,0%	
R-R5	100,0%	1,3%	0,6%	ca. 0.04xWT
F-/R-WT	100,0%	3,2%	1,5%	ca. 160xBG
F-WT	100,0%	4,0%	2,0%	ca. 140xBG
F-dS4	7,8%	1,8%	2,0%	
F-R4a	10,9%	100,0%	2,4%	
F-R4b	5,1%	9,3%	100,0%	
F-R5	100,0%	1,5%	0,6%	ca. 0.07xWT

Tabelle 3 5X Array

Charakteristik: waschen mit Waschpuffer 1; 61°C, (20sec Waschpufferzufuhr)
60min schütteln, 37°C

Ergebnisse

Festphase mit verschiedenen Sonden in getrennten Spots										
Probe	cS3	VK	cS4	VK	cR4a	VK	cR4b	VK	cS5	VK
R-WT	378	2,1%	2797	9,3%	382	3,0%	354		1720	2,5%
R-dS4	354	4,5%	428	6,4%	378		378		2651	13,9%
R-R4a	355	2,2%	581	8,4%	10154	5,9%	464	2,5%	6959	2,6%
R-R4b	372		462	3,9%	498	1,7%	3761	4,1%	8833	5,0%
R-R5	390	2,6%	8289	9,4%	399	3,0%	354		410	1,5%
F-/R-WT	501	4,2%	7890	4,8%	515	4,0%	429	9,2%	6138	1,3%
F-WT	356		309	36,4%	356		356		851	57,9%
F-dS4	404	5,4%	481	6,7%	348		348		7849	4,0%
F-R4a	414	3,4%	574	7,5%	3014	7,4%	391		6856	4,0%
F-R4b	385	2,8%	430	4,3%	464	1,9%	2633	4,4%	9879	2,9%
F-R5	393	2,4%	11210	6,2%	421	1,9%	366		520	2,3%

Festphase				
Probe	cS4	cR4a	cR4b	cS5
R-WT	100,0%	13,7%	12,7%	100,0%
R-dS4	15,3%	13,5%	13,5%	
R-R4a	5,7%	100,0%	4,6%	
R-R4b	12,3%	13,2%	100,0%	
R-R5	100,0%	4,8%	4,3%	23,2%
F-/R-WT	100,0%	6,5%	5,4%	
F-WT	100,0%	44,0%	44,0%	100,0%
F-dS4	59,5%	43,0%	43,0%	
F-R4a	19,0%	100,0%	13,0%	
F-R4b	16,3%	17,6%	100,0%	
F-R5	100,0%	3,8%	3,3%	34,4%

[0075] Tabelle 4 zeigt dasselbe für das erweiterte 12X (12 Sonden) Array unter den Bedingungen 90 min Hybridisierung bei 37°C, 30 min Konjugatreaktion bei RT, Probenwaschschritt bei 60°C für 20 sec, durchgeführt am semi-automatischen DNA Inkubator/Schüttler/Waschmodul. Zu diesem Zeitpunkt war der Test für die neu hinzugekommenen Regionen 1 und 2 noch nicht optimiert, so daß primär die Regionen 4 und 5 (wie beim kleineren anfänglichen Array) heranzuziehen sind. Die Lage der Regionen ist in FIG 3 angegeben.

Tabelle 4

12X Array

R-Amplicon

Probe Nr	Name	Festphase mit verschiedenen Sonden in getrennten Spots						
		cS3	cS4	cR4a	cR4b	cdS4	cS5	cR5
3	WT 3.11		100,0%	2,1%	0,5%	7,1%	100,0%	0,8%
4	WT 3.11		100,0%	2,4%	0,3%	5,2%	100,0%	1,2%
5	R1a		100,0%	0,5%	0,2%	1,2%	100,0%	2,1%
6	R1a		100,0%	0,4%	0,2%	2,6%	100,0%	2,8%
7	R2		100,0%	0,4%	0,1%	0,4%	100,0%	1,1%
8	R2		100,0%	0,4%	0,1%	0,8%	100,0%	1,5%
9	R4a		12,9%	100,0%	1,5%	2,0%	100,0%	0,9%
10	R4a		13,1%	100,0%	3,3%	5,3%	100,0%	3,1%
11	R4b		14,3%	7,9%	100,0%	9,6%	100,0%	2,7%
12	R4b		7,4%	4,2%	100,0%	5,2%	100,0%	0,8%
13	dS4		19,1%	0,5%	0,2%	100,0%	100,0%	1,3%
14	dS4		15,5%	0,4%	0,1%	100,0%	100,0%	0,6%
15	R5		100,0%	2,5%	2,3%	14,2%	0,4%	100,0%
16	R5		100,0%	1,5%	0,7%	9,0%	1,4%	100,0%
17	WT F/R-Amp.		100,0%	6,8%	1,2%	10,4%	100,0%	3,2%
18	WT F/R-Amp.		100,0%	4,9%	1,1%	22,1%	100,0%	1,8%
19	WT 3.11.		100,0%	3,0%	0,3%	8,2%	100,0%	1,0%
20	WT 3.11		100,0%	3,0%	0,6%	20,4%	100,0%	0,6%

F-Amplicons

Probe Nr	Name	Festphase						
		cS3	cS4	cR4a	cR4b	cdS4	cS5	cR5
3	WT 3.11		100,0%	4,6%	1,0%	20,3%	100,0%	3,4%
4	WT 3.11		100,0%	7,6%	2,6%	18,2%	100,0%	2,8%
5	R1a		100,0%	0,5%	0,2%	1,7%	100,0%	1,5%
6	R1a		100,0%	0,8%	0,5%	0,9%	100,0%	3,4%
7	R2		100,0%	1,7%	0,1%	5,3%	100,0%	3,6%
8	R2		100,0%	3,4%	0,6%	2,6%	100,0%	5,8%
9	R4a		53,6%	100,0%	2,4%	1,4%	100,0%	4,1%
10	R4a		90,4%	100,0%	1,2%	5,8%	100,0%	2,4%
11	R4b		29,3%	15,5%	100,0%	15,3%	100,0%	8,3%
12	R4b		54,7%	25,9%	100,0%	16,8%	100,0%	8,9%
13	dS4		50,4%	1,8%	0,7%	100,0%	100,0%	1,8%
14	dS4		51,0%	2,3%	0,5%	100,0%	100,0%	0,3%
15	R5		100,0%	10,9%	12,3%	5,6%	6,2%	100,0%
16	R5		100,0%	1,9%	0,4%	3,6%	2,4%	100,0%
17	WT F/R-Amp.		100,0%	5,8%	2,8%	17,8%	100,0%	1,8%
18	WT F/R-Amp.		100,0%	5,5%	0,7%	24,6%	100,0%	2,3%
19	WT 3.11.		100,0%	6,4%	2,6%	6,4%	100,0%	3,3%
20	WT 3.11		100,0%	4,5%	0,6%	21,9%	100,0%	1,1%

[0076] In allen Fällen wird deutlich, daß bei Verwendung von R-Amplicons, d. h. indirekter Nachweis über den Strangreassoziationskomplex, überraschend eine signifikant bessere Diskriminierung erreichbar war als mit direktem Nachweis von sondengebundenen F-Amplicons.

[0077] Dieser überraschende Effekt kommt besonders dann zum Tragen, wenn einzelsträngige Analyt-DNA oder RNA sehr stark zu stranginterner Sekundärstrukturbildung neigt, so daß räumliche Umorientierungsprozesse die Zugänglichkeit der nachzuweisenden Gruppe beeinflussen. Dies ist für das amplifizierte rpo- β -Gensegment der Fall (siehe FIG 4: 2D-Faltungsvorschlag nach einem Algorithmus von Dr. Zuker, Washington University, Institute for Biomedical Computing). In FIG 5 wurde versucht, die Situation für den Fall bildlich zu illustrieren, in dem (ungleich zu der vorliegenden Erfindung) die Fangsonde direkt mit dem markierten Strang hybridisieren würde, wenn stranginterne Reassoziatio

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENCE LISTING

5 <110> Roche Diagnostics GmbH
 <120> DNA-Nachweis ueber einen Strangreassoziationskomplex
 <130> 4851a1

10 <140>
 <141>
 <160> 18
 <170> PatentIn Ver. 2.0

15 <210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

20 <400> 1
 tcgccgcgat caaggagt 18
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

25 <400> 2
 tgcacgtcgc ggacctcca 19
 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

30 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate ester with digoxigenin

35 <400> 3
 tcgccgcgat caaggagt 18
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

40 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate ester with digoxigenin

45 <400> 4
 tgcacgtcgc ggacctcca 19
 <210> 5
 <211> 157
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

50
 55

EP 0 962 536 A1

5
 <400> 5
 tgcgcgcgat caaggagttc ttcggcacca gccagctgag ccaatttatg gaccagaaca 60
 acccgctgtc ggggttgacc cacaagcgcc gactgtcggc gctggggccc ggcgggtctgt 120
 cacgtgagcg tgccgggctg gaggtccgcy acgtgca 157

10
 <210> 6
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

15
 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

20
 <400> 6
 tttttttttt tttttttttt attggctcag ctggctgg 38

25
 <210> 7
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

30
 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

35
 <400> 7
 tttttttttt tttttttttt ttggctcggc tggctggg 38

40
 <210> 8
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

45
 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

50
 <400> 8
 tttttttttt tttttttttt gttgttctgg tccatgaa 38

55
 <210> 9
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

60
 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

65
 <400> 9
 tttttttttt tttttttttt gttgttctgg agcatgaa 38

70
 <210> 10
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

EP 0 962 536 A1

5
 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

 <400> 10
 tttttttttt tttttttttt caaccccgac agcgggtt 38

 10
 <210> 11
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 15 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

 <400> 11
 tttttttttt tttttttttt tcaaccccgga cagcgggt 38

 20
 <210> 12
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

 <220>
 <221> misc_signal
 25 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

 <400> 12
 tttttttttt tttttttttt tcggcgcttg tgggtcaa 38

 30
 <210> 13
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

 <220>
 <221> misc_signal
 35 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

 <400> 13
 tttttttttt tttttttttt tcggcgcttg taggtcaa 38

 40
 <210> 14
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

 <220>
 <221> misc_signal
 45 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker

 <400> 14
 50 tttttttttt tttttttttt tcggcgcttg tcggtcaa 38

 <210> 15
 <211> 38
 <212> DNA

 55

EP 0 962 536 A1

5 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker
 <400> 15
 tttttttttt tttttttttt tcggcgcttg cgggtcaa 38
 10 <210> 16
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 15 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker
 <400> 16
 tttttttttt tttttttttt ccccagcgcc gacagtcg 38
 20 <210> 17
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 25 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker
 <400> 17
 30 tttttttttt tttttttttt ccccagcgcc aacagtcg 38
 <210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 35 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)
 <223> Phosphate linked to biotin via Aminolinker
 <220>
 40 <221> misc_signal
 <222> (27)
 <223> Y means incorporation of
 Aminolinker-phosphoramidite subsequently esterified
 with 3-O carboxymethyl digoxigenin
 45 <400> 18
 tttttttttt tttttttttt ttttyt 27
 1
 50 32
 1
 55

Patentansprüche

1. Verfahren zum selektiven Nachweis einer Nukleinsäure enthaltend die Schritte

- 5 - Amplifikation der Nukleinsäure oder eines Teils davon mit Hilfe zweier Primer, von denen einer mit einem Strang der nachzuweisenden Nucleinsäure und der andere mit einem hierzu komplementären Strang hybridisieren kann und von denen mindestens einer eine nachweisbare Markierung gebunden enthält, unter Bildung jeweils eines Verlängerungsproduktes dieser Primer in einer Reaktionsmischung,
- 10 - Bindung einer Fangsonde an eines dieser Verlängerungsprodukte unter Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes, der die Fangsonde und mindestens dieses Verlängerungsprodukt enthält,
- Abtrennung des an die Fangsonde gebundenen Verlängerungsproduktes von nicht gebundenen Anteilen der Reaktionsmischung, und
- 15 - Bestimmung der an die Fangsonde gebundenen nachweisbaren Markierung, dadurch gekennzeichnet, daß die Fangsonde so gewählt wird, daß sie mit dem Strang des Verlängerungsproduktes binden kann, der auch mit dem durch Verlängerung des markierten Primers gebildeten Verlängerungsprodukt hybridisieren kann.
- 20 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nur einer der zwei Primer die nachweisbare Markierung enthält, nämlich der, welcher das mit der Fangsonde antiparallel-komplementäre, nicht direkt hybridisierungsfähige Verlängerungsprodukt erzeugt.
- 25 3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Fangsonde an eine Festphase gebunden ist.
4. Verfahren gemäß des Anspruches 3, dadurch gekennzeichnet, daß der gebildete festphasengebundene Hybridisierungskomplex durch ein signalgebendes oder signalerzeugendes Nachweisreagenz sichtbar gemacht wird, das eine mit der Primer-Markierung bindefähige Komponente enthält.
- 30 5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Nachweisreagenz eine partikuläre signalgebende oder signalvermittelnde Komponente enthält.
- 35 6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verlängerungsprodukte zunächst in einzelsträngige Form gebracht werden und dann in Kontakt mit der Fangsonde gebracht werden und Bedingungen eingestellt werden, bei denen die Fangsonde an den Strang des Verlängerungsproduktes binden kann.
- 40 7. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das in Kontaktbringen mit der Fangsonde und das Einstellen von Bindungsbedingungen im wesentlichen gleichzeitig geschieht, so daß der Reaktionsstart für die Bindung der Fangsonde an das Verlängerungsprodukt im wesentlichen identisch ist mit dem Reaktionsstart für eine Reassoziaton der Verlängerungsproduktstränge.
- 45 8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Verlängerungsprodukte durch alkalische Denaturierung in einzelsträngige Form gebracht werden und das Einstellen von Bindungsbedingungen eine Neutralisierung beinhaltet.
- 50 9. Verfahren zum selektiven Nachweis von spezifischen Sequenzen in einer oder mehrerer Nukleinsäure(n) aus einer Probe enthaltend die Schritte
- Amplifikation der Nucleinsäure(n) oder Teilen davon mit Hilfe mindestens eines Sets von zwei Primern, von denen einer mit einem Strang der Nucleinsäure(n) und der andere mit einem hierzu komplementären Strang hybridisieren kann und von denen mindestens einer eine nachweisbare Markierung gebunden enthält, unter Bildung von Verlängerungsprodukten dieser Primer für jede dieser Sequenzen,
- 55 - Bindung jeweils eines Verlängerungsproduktes an jeweils eine Fangsonde, die dieses Verlängerungsprodukt selektiv binden kann, sofern die Sequenz in der Probe enthalten war, unter Bildung von Hybridisierungskomplexen,

- Abtrennung der an die Fangsonden gebundenen Verlängerungsprodukte von nicht gebundenen Anteilen der Reaktionsmischung, und

- Bestimmung der an die Fangsonden gebundenen nachweisbaren Markierung, dadurch gekennzeichnet, daß die Fangsonden so gewählt werden, daß sie jeweils mit dem Strang des Verlängerungsproduktes hybridisieren können, der eine zu der Sequenz der Fangsonde komplementäre Sequenz enthält und der auch mit dem durch Verlängerung des markierten Primers gebildeten Verlängerungsprodukt hybridisieren kann.

10 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Fangsonden an räumlich getrennte, unterscheidbare Bereiche einer Festphase gebunden sind.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß nur ein Primer jedes Sets ein mit einer nachweisbaren Gruppe markierter Primer ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß dieser Primer für die Bildung von Verlängerungsprodukten aus einer Vielzahl von spezifischen Sequenzen verwendet wird.

13. Reagenzkit zum Nachweis von Nucleinsäuren enthaltend in getrennten Behältern

- mindestens einen Primer, der eine nachweisbare Markierung gebunden enthält, zur Amplifikation der Nucleinsäuren oder Teilen davon,
- mindestens 2 immobilisierbare oder immobilisierte Fangsonden unterschiedlicher Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer so gewählt wird, daß er mit demselben Strang des Verlängerungsproduktes hybridisieren kann wie die Fangsonden.

14. Verwendung eines Reagenzienkits, enthaltend mindestens einen nachweisbar markierten Primer und mindestens 2 immobilisierte oder immobilisierbare Fangsonden mit unterschiedlicher Sequenz, wobei der mindestens eine nachweisbar markierte Primer so gewählt wird, daß er mit demselben Strang jeder Zielnucleinsäure hybridisieren kann wie die Fangsonden, bei der Mutationsanalyse.

FIG 1

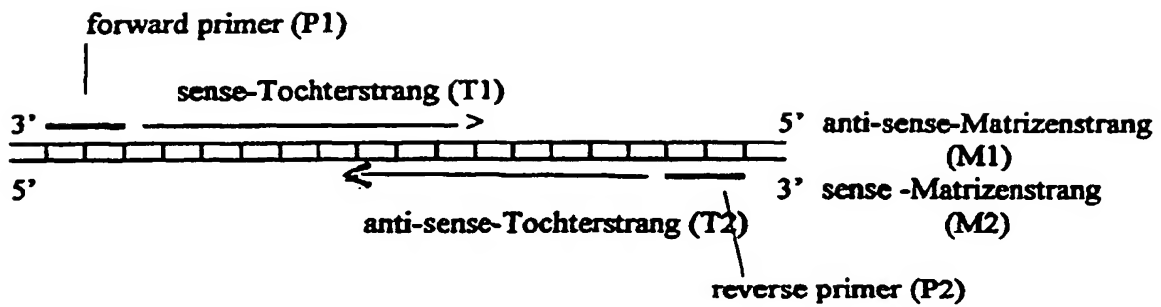


FIG 2

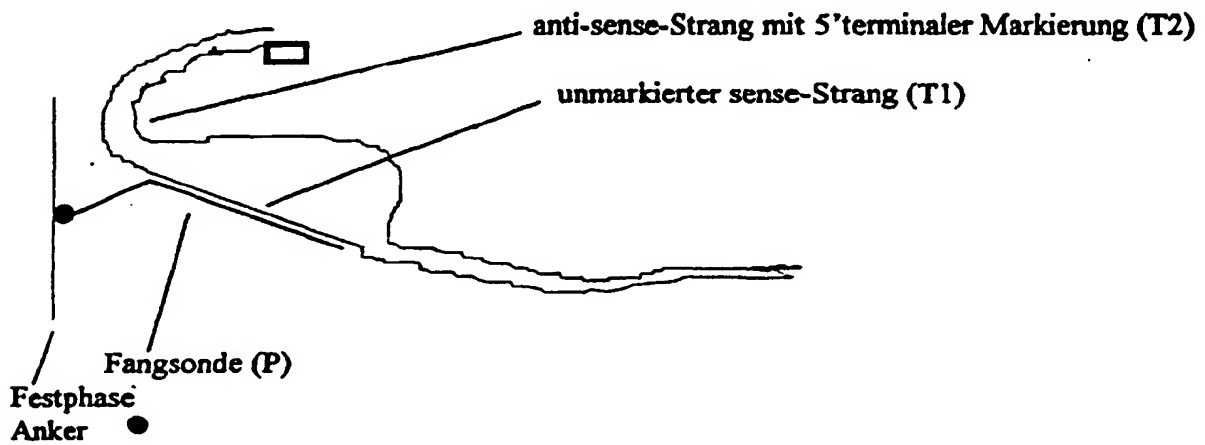


FIG 3

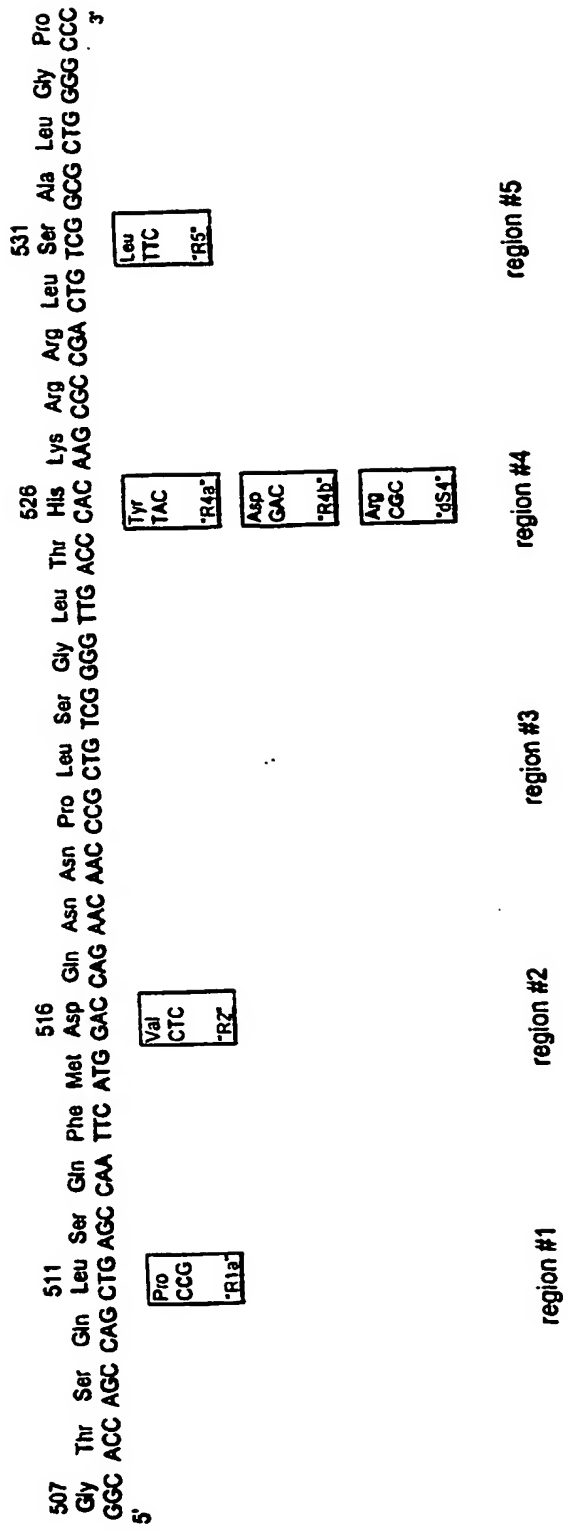


FIG 4

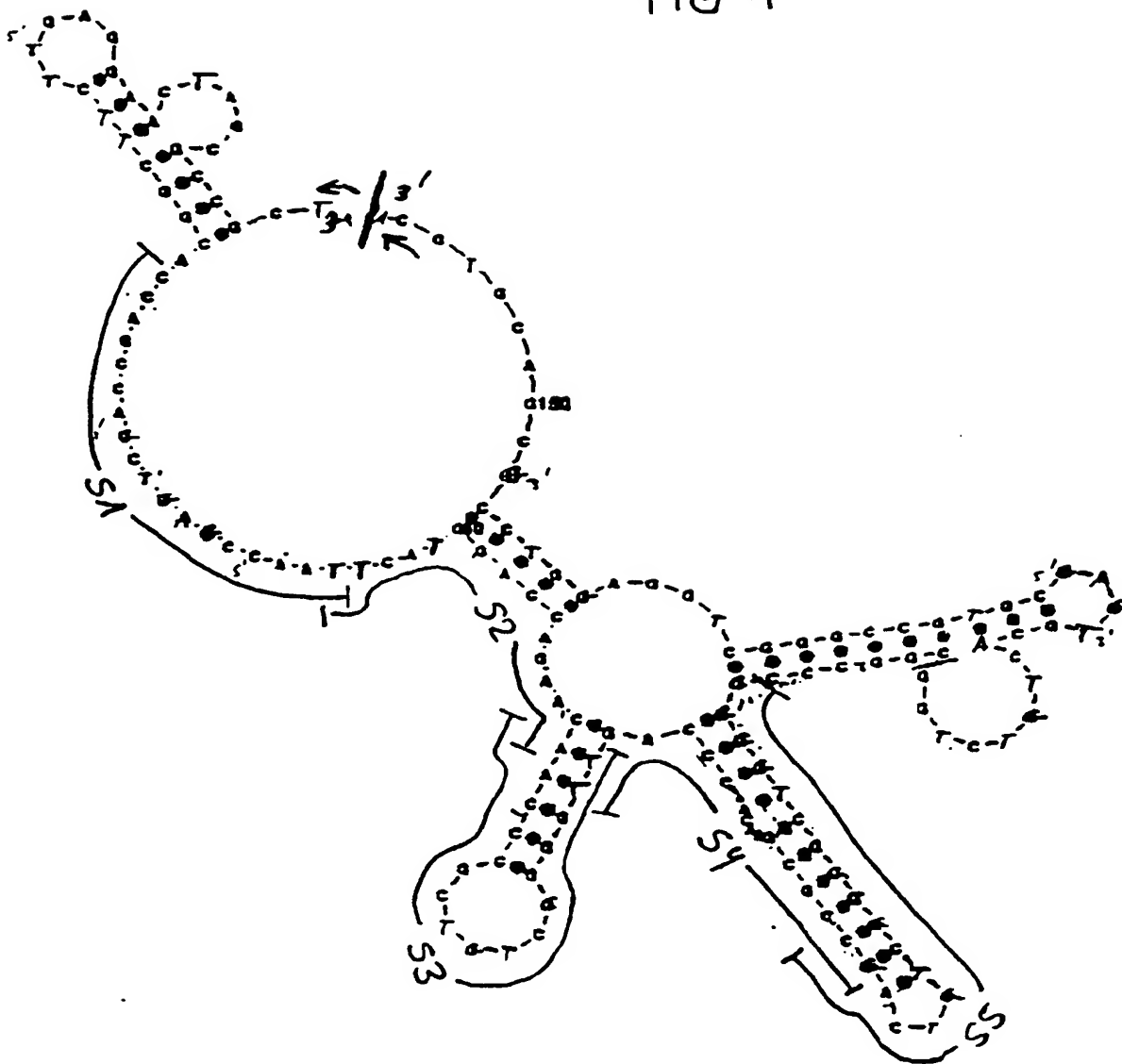
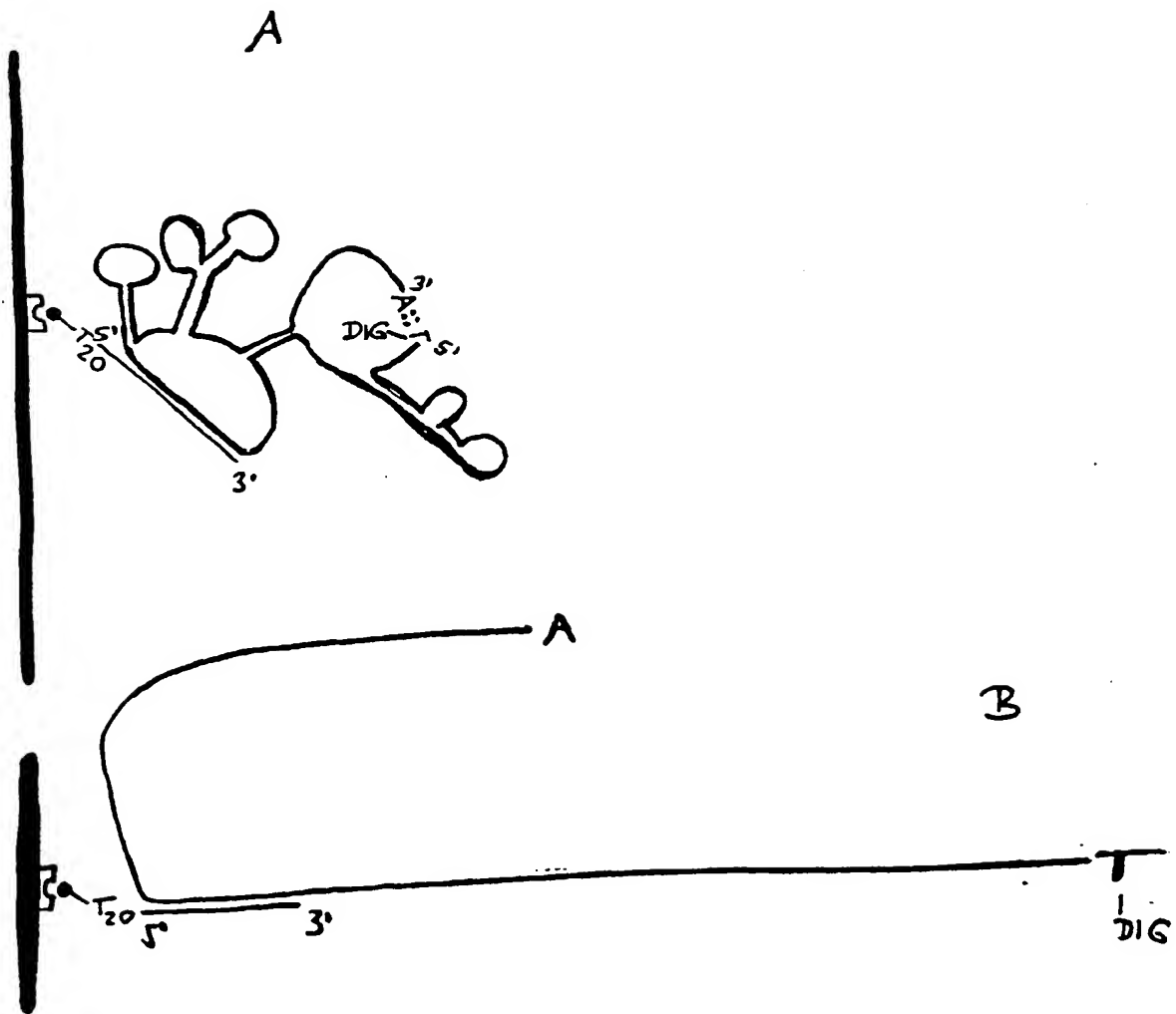


FIG 5





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 99110458.9
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 6)
A	DE 4041608 A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) 25 Juni 1992 (25.06.92), Beispiele 1-3, Ansprüche 21-23. ---	1-6, 8,9, 11,12	C 12 Q 1/68
A	WO 97/47640 A1 (SARNOFF CORPORATION) 18 Dezember 1997 (18.12.97), Seiten 4,6, Ansprüche 1,10. ---	1,3,4	
A	WO 95/25538 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 28 September 1995 (28.09.95), Beispiele 1-8, Fig. 1-6. ----	1-6,9, 11,12	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 6)
			C 12 Q 1/00
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 09-09-1999	Prüfer MOSSER
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument I : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EP Form 1503 03/82

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR. EP 99110458.9

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der in obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der EPIDOS-INPADOC-Datei am 16. 9.1999
Diese Angaben dienen zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

In Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE A1	4041608	25-06-1992	AT E	122104	15-05-1995
			AU A1	86275191	28-04-1995
			AU B2	6835781	12-01-1999
			CA AA	2093647	10-04-1999
			DE CO	59108402	08-06-1999
			DK TS	5502202	02-10-1999
			EP B1	4444403	28-07-1999
			FR B1	2685544	08-05-1999
			GB A	2093647	16-08-1999
			IT A	9221587	07-04-1999
			JP AO	9311588	07-04-1999
			SE B	9311588	18-06-1999
			SI AO	9311588	18-06-1999
			UK E2	6501157	10-03-1999
			US E2	5577111	06-11-1999
			NO A0	9313006	06-04-1999
			NO B1	9313006	06-04-1999
			PT A	2400078	20-08-1999
			RU A	991177	20-07-1999
			US A1	9220621	16-04-1999
			US A1	4038634	16-04-1999
			US E	1500922	16-03-1999
			CA AA	2093647	10-04-1999
			CO A1	5910840	17-06-1999
			EP B1	4444403	15-04-1999
			ES A	4802389	12-04-1999
			JP A	2101706	16-07-1999
			JP B4	4255829	14-09-1999
			ZA A	6040832	01-06-1999
				9108024	29-07-1999
WO A1	9747640	18-12-1997	AU A1	32320197	07-01-1999
			EP A1	918786	23-06-1999
			US A	5770370	02-06-1999
WO A1	9525538	28-09-1995	AU A1	21872195	09-10-1999
			EP A1	812211	17-12-1997
			EP A4	812211	16-12-1999

Bezüglich näherer Einzelheiten zu diesem Anhang siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamtes, Nr. 12/82.